

PCT/JP03/13353 20 APR 2005

PCT/JP03/13353

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

20.10.03

RECEIVED

04 DEC 2003

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年10月23日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-307922
[ST. 10/C]: [JP2002-307922]

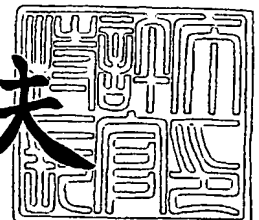
出 願 人
Applicant(s): 天野エンザイム株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-661

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 岐阜県各務原市須衛町四丁目 1 7 9 番 3 5 天野エン
ザイム株式会社 岐阜研究所内

【氏名】 鈴木 哉子

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学大学院生命農
学研究科

【氏名】 塚越 規弘

【特許出願人】

【識別番号】 000216162

【氏名又は名称】 天野エンザイム株式会社

【代理人】

【識別番号】 100095577

【弁理士】

【氏名又は名称】 小西 富雅

【選任した代理人】

【識別番号】 100100424

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 知公

【選任した代理人】

【識別番号】 100114362

【弁理士】

【氏名又は名称】 萩野 幹治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 045908

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0201265

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 イソマルトース生成酵素の遺伝子が欠損した、真菌類に属する微生物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 真菌類に属し且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子を欠損した微生物。

【請求項 2】 糸状菌に分類される微生物である、請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 3】 α -グルコシダーゼB遺伝子が欠損したアスペルギルス・ニドランス。

【請求項 4】 真菌類に属し且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子を欠損した微生物に、イソマルトースでその発現が誘導される外来遺伝子を導入してなる形質転換体。

【請求項 5】 前記微生物が糸状菌に分類される微生物である、請求項 4 に記載の形質転換体。

【請求項 6】 α -グルコシダーゼB遺伝子を欠損したアスペルギルス・ニドランスに、イソマルトースでその発現が誘導される外来遺伝子を導入してなる形質転換体。

【請求項 7】 前記外来遺伝子が次の改変プロモータを含有する、請求項 4 ～ 6 のいずれかに記載の形質転換体、

糸状菌で機能するプロモーターに、CCAATNNNNNN（第 1 塩基配列：配列番号 1）を含む第 1 DNA断片と、CGGNNNNNNNNNGG（第 2 塩基配列：配列番号 2）を含む第 2 DNA断片と、を挿入してなる改変プロモーター。

【請求項 8】 前記外来遺伝子が発現可能な条件下で請求項 4 ～ 7 のいずれかの形質転換体を培養するステップ、及び

産生されたタンパク質を回収するステップ、
を含む、タンパク質の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明はタンパク質の生産に利用される微生物に関する。詳しくは、タンパク質生産用微生物を作製するための宿主として用いることができる微生物、タンパク質生産用微生物、及び該微生物を用いたタンパク質の生産方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

糸状菌は菌体外に各種の酵素蛋白質を分泌生産することが知られている。糸状菌の持つこうした特性を利用して古来より味噌、醤油、清酒製造などの醸造分野や酵素製剤の製造にAspergillus属糸状菌を始めとする各種の糸状菌が広く用いられてきた。菌体外酵素の生産能力を高めるために長期間にわたる育種が行われた結果、培養液1リットルあたり数十グラムの酵素蛋白質を生産できる菌株も得られている。

一方、近年の遺伝子組換え技術の応用により多様な蛋白質の生産が可能となった。遺伝子組換え菌による酵素蛋白質の生産においては目的の酵素を大量に生産させるための手段として、遺伝子の転写能力を高める事が高生産に繋がるとの考えから、より強い転写能力を持つプロモーターを検索し、これを利用することが行われている。このような観点から、これまでに種々の糸状菌由来のプロモーターが単離され、それらを用いたタンパク質の生産系が報告されている。例えば、アスペルギルス・オリゼのアミラーゼ遺伝子のプロモーター（例えば特許文献1及び非特許文献1参照）、アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター（例えば非特許文献2参照）等が単離され、利用に供されている。さらに、エンハンサーの導入や調節領域の改変などによりプロモーターの能力を高める事も行われてきた。以上のようなプロモーターの能力に依存した遺伝子産物の生産によって、旧来の育種法による能力増強に比べると効率的に生産能力を上げる事が出来ている。しかしながら、絶対生産量として菌体外酵素蛋白質の生産量を上げるためには更に旧来の育種法を適用しての宿主菌株の育種改良が行われていた。

【0003】**【特許文献1】**

特開昭62-272988号公報

【非特許文献 1】

Biotechnology, 5, 368(1987)

【非特許文献 2】

Biotechnology, 6, 1419(1988)

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は以上の背景に鑑み、目的のタンパク質をコードする遺伝子を導入した際に当該遺伝子の発現を効率的に高めることが可能な宿主微生物を提供することを目的とする。また、目的のタンパク質を高い効率で産生可能な形質転換体を提供することを目的とする。更には、目的のタンパク質を高い生産性で生産することが可能な生産方法を提供することをも目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは以上の課題を解決すべく麹菌タカアミラーゼAに注目して種々の検討を行った。麹菌タカアミラーゼAはデンプンやマルトースで誘導され、グルコースで抑制される典型的な誘導酵素である。麹菌タカアミラーゼA遺伝子の誘導機構は詳細に解析されており、AmyRにより転写誘導が制御され、真の転写誘導物質はイソマルトースである事が明らかにされている。デンプンやマルトースにより麹菌タカアミラーゼA遺伝子が転写誘導されるのは、デンプンやマルトースに α -グルコシダーゼが作用することによりイソマルトースが生成することに起因することが明らかにされている。

【0006】

本発明者らはまず、麹菌タカアミラーゼA遺伝子の誘導機構を解明する過程で、アスペルギルス・ニドランスにおける主たるイソマルトース生成酵素である α -グルコシダーゼBに着目し、これを欠損する変異株(Δ agdB株)を作製した。続いて当該欠失変異株にタカアミラーゼA遺伝子を導入した。このようにして得られた形質転換体において、イソマルトース源となるデンプン及びマルトースを用いてタカアミラーゼA遺伝子の誘導効果を調べたところ、コントロール(野生株

を宿主としてタカアミラーゼA遺伝子を導入した形質転換体)に比較して飛躍的にタカアミラーゼAが発現していることが判明した。この結果から、イソマルトースによる発現誘導を受ける遺伝子のコードするタンパク質を生産する目的において、主たるイソマルトース生成酵素遺伝子を欠損した微生物を宿主として用いることが極めて有効な手段となるとの知見が得られた。本発明はかかる知見に基づき完成されたものであって次の各構成を提供する。

[1]真菌類に属し且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子を欠損した微生物。

[2]糸状菌に分類される微生物である、[1]に記載の微生物。

[3] α -グルコシダーゼB遺伝子が欠損したアスペルギルス・ニドランス。

[4]真菌類に属し且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子を欠損した微生物に、イソマルトースでその発現が誘導される外来遺伝子を導入してなる形質転換体。

[5]前記微生物が糸状菌に分類される微生物である、[4]に記載の形質転換体。

[6] α -グルコシダーゼB遺伝子を欠損したアスペルギルス・ニドランスに、イソマルトースでその発現が誘導される外来遺伝子を導入してなる形質転換体。

[7]前記外来遺伝子が次の改変プロモータを含有する、[4]~[6]のいずれかに記載の形質転換体、

糸状菌で機能するプロモーターに、CCAATNNNNNN(第1塩基配列:配列番号1)を含む第1DNA断片と、CGGNNNNNNNNNGG(第2塩基配列:配列番号2)を含む第2DNA断片と、を挿入してなる改変プロモーター。

[8]前記外来遺伝子が発現可能な条件下で[4]~[7]のいずれかの形質転換体を培養するステップ、及び

産生されたタンパク質を回収するステップ、
を含む、タンパク質の生産方法。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の構成を詳細に説明する。本発明の第1の局面は、真菌類に属し

且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子が欠損した微生物を提供する。当該微生物は特定のタンパク質を生産する際に利用される形質転換体を作製する場合の宿主として用いられ得る。本発明における「真菌類に属する微生物」は特に限定されない。例えば、アスペルギルス・オリゼやアスペルギルス・ニドランス、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリ、ペニシリウム・クリソゲノム、ニューロスポラ・クラッサ、トリコデルマ・レッセイなどの糸状菌（ツボカビ門、接合菌門、子囊菌門、サビキン類、不完全菌類を含む）が含まれる。尚、本発明における糸状菌とは広義の糸状菌を意味し、酵母（子囊菌類、端子菌類、不完全菌類）を包含する。

【0008】

本発明における「主たるイソマルトース生成酵素」とは当該微生物においてイソマルトースの生成に最も関与している酵素のことをいう。即ち、対象の微生物がイソマルトース生成活性を有する異なる種類の酵素を有する場合には、これら複数の酵素の中で最も活性の高いものがここでの主たるイソマルトース生成酵素に該当する。本発明における微生物は少なくともこのような酵素をコードする遺伝子が欠損しておればよく、例えばイソマルトースの生成に関与するその他の酵素（二つ以上ある場合には複数であってもよい）の遺伝子があわせて欠損していてもよい。イソマルトース生成酵素の具体例としては α -グルコシダーゼA、 α -グルコシダーゼB、トランスグルコシダーゼ、グルクアミラーゼ、イソプルラナーゼを挙げることができる。

【0009】

自然界に存在する微生物又は保存機関などから入手される微生物から適切なものを選択し、これに主たるイソマルトース生成酵素をコードする遺伝子が欠損するように変異処理を施すことによって本発明における微生物を作製することができる。変異処理の方法としては例えば、欠損させようとする遺伝子に相当する配列に予め変異を加えたものを含むベクターを用意し、これを宿主微生物の染色体に遺伝子工学的手法を用いて組込み、これによって宿主微生物染色体上に存在する目的の遺伝子を破壊する方法や、部位特異的変異法などを用いることができる。

【0010】

本発明の第二の局面は上記微生物を宿主として外来遺伝子を導入することにより得られる形質転換体に関し、具体的には、真菌類に属し且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子が欠損した微生物に、イソマルトースでその発現が誘導される外来遺伝子を導入してなる形質転換体を提供する。かかる本発明の形質転換体はタンパク質の生産に利用することができる。

【0011】

本発明の形質転換体を作製する際に用いられる形質転換方法は特に限定されず、公知の形質転換方法から適当なものを選択できる。例えばプロトプラスト化した菌体を用いたTurnerらの方法 (Gene, 36, 321-331(1985)) を利用することができる。その他、五味らの方法 (Agric. Biol. Chem., 51, 323-328(1987)) などを採用してもよい。

形質転換をベクターを用いて行う場合において、使用されるベクターの種類は特に限定されない。例えば、宿主との関係において形質転換に適した市販のベクターを用意し、これに目的の遺伝子を挿入したものをを用いることができる。

【0012】

ベクターには、宿主微生物を形質転換した際に形質転換体を選択するのに好適な選択マーカーが組込まれていることが好ましい。選択マーカーは使用する宿主との関係で適当なものが採用される。オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子 (argB)、硝酸還元酵素遺伝子 (niaD)、アセトアミダーゼ遺伝子 (amdS)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpC)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子 (DHFR) 等の栄養要求性相補遺伝子、オリゴマイシン、デストマイシン、ハイグロマイシン等に対する薬剤耐性遺伝子などを選択マーカーの具体例として挙げるることができる。

【0013】

本発明において使用される外来遺伝子は、原則的にはプロモーターと構造遺伝子 (コード領域) とを含む。但し、形質転換に供される宿主微生物のプロモーターを利用できる場合 (予め外来的に適当なプロモーターが宿主微生物に導入されている場合も含む) には、本発明の外来遺伝子としてプロモーター領域を含まな

いもの、即ちコード領域のみを含むものやコード領域及びターミネータ領域のみを含むものなどを用いてもよい。

プロモーターとしてはイソマルトースで誘導されるという性質を有するものが用いられ、一方、構造遺伝子としては形質転換体に組込まれた後に当該プロモーターの支配下となるものが用いられる。このような条件を満たす限りプロモーター及び構造遺伝子は特に限定されず、プロモーターとしては例えばアスペルギルス属、ペニシリウム属、トリコデルマ属等の微生物におけるタンパク質をコードする遺伝子の中でイソマルトースによる誘導が行われるプロモーターを用いることができる。より具体的には、アスペルギルス属の α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ等をコードする遺伝子のプロモーターを用いることができる。中でも、アスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼのプロモーターを用いることが好ましい。これらのプロモーターはそれを有する微生物より制限酵素処理、PCR法などの遺伝子工学的手法を用いて取得することができる。また、目的とするプロモーターが組込まれたベクターを利用できる場合には当該ベクターから制限酵素処理やPCR法などによって取得することができる。一方、構造遺伝子としては例えば、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ等の糖質関連酵素をコードする遺伝子や、キモシン等のプロテアーゼをコードする遺伝子、或はリパーゼをコードする遺伝子などを用いることができる。尚、同種タンパク質をコードする遺伝子であっても異種タンパク質をコードする遺伝子であってもよい。ここでの同種タンパク質とは、宿主微生物が本来的に産生するタンパク質を意味する。一方、異種タンパク質とは、宿主微生物が本来は産生しないタンパク質、即ち外来的にそれをコードする遺伝子が導入されることにより初めて産生されるタンパク質を意味する。

形質転換の際にプロモーターと構造遺伝子（コード領域）とが同一のベクターから供与される必要はない。即ち、導入用プロモーターを保有する第1のベクターと、導入用構造遺伝子を保有する第2のベクターとを用意し、これら両者を用いて形質転換を行うことにより目的の外来遺伝子が導入された形質転換体を得ることとしてもよい。

【0014】

自然界に存在するプロモーターを改変して得られる改変プロモーターを用いることもできる。以下に改変プロモーターの具体例を示す。尚、以下の説明においてプロモーター活性を高めることができる機能を「エンハンサー機能」という。

(1)糸状菌で機能するプロモーターに、CCAATNNNNN（第1塩基配列：配列番号1）を含む第1DNA断片と、CGNNNNNNNNNGG（第2塩基配列：配列番号2）を含む第2DNA断片と、を挿入してなる改変プロモーター。

(2)前記第1塩基配列がCCAATTAGAAG（配列番号3）である、(1)に記載の改変プロモーター。

(3)前記第2塩基配列がCGGHNWWWWNWHGG（配列番号4）である、(1)又は(2)に記載の改変プロモーター。

(4)前記第2塩基配列がCGGWWWWWWWHGG（配列番号5）である、(1)又は(2)に記載の改変プロモーター。

(5)前記第2塩基配列がCGGAAATTTAAAGG（配列番号6）、CGGAATTTAAACGG（配列番号7）又はCGGAAATTTAACGG（配列番号8）である、(1)又は(2)に記載の改変プロモーター。

(6)前記プロモーターの5'末端側から3'末端側に向かって順に第1DNA断片、第2DNA断片が並ぶよう挿入される、(1)～(5)のいずれかに記載の改変プロモーター。

(7)前記プロモーターに存在するCCAAT配列よりも5'側上流域、又はプロモーター領域に存在するSRE領域よりも3'側下流域に前記第1DNA断片及び前記第2DNA断片が挿入される、(6)に記載の改変プロモーター。

(8)複数個の前記第1DNA断片及び複数個の前記第2DNA断片が挿入される、(1)～(7)のいずれかに記載の改変プロモーター。

(9)前記第1DNA断片と前記第2DNA断片が同じ数ずつ挿入される、(8)に記載の改変プロモーター。

(10)一つの第1DNA断片と一つの第2DNA断片とが組みをなし、かつ各組において第1DNA断片が前記プロモーターの5'末端側に位置するように、前記プロモーターに前記第1DNA断片と前記第2DNA断片が挿入される、(9)に記載の改変プロモーター。

(11)糸状菌で機能するプロモーターに、配列番号9の塩基配列を有するDNA断片、又は該DNA断片の一部が改変されたDNA断片であってエンハンサー機能を有するDNA断片を1～数个組込んでなる改変プロモーター。

(12)前記糸状菌で機能するプロモーターがアスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼのプロモーターである、(1)～(11)のいずれかに記載の改変プロモーター。

尚、以上においてNはA、T、C、Gのいずれかであることを表す。

【0015】

以上の改変プロモーターにおける第1DNA断片及び第2DNA断片は、例えば市販のDNA合成機を用いて合成することができる。また、例えばアスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼA遺伝子のプロモーター領域を鋳型とし、適当なプライマーを用いたPCR法によって調製することもできる。

第1DNA断片及び第2DNA断片を含む一つのDNA断片を調製し、これを糸状菌で機能するプロモーターへ組込むことにより改変プロモーターを作製することもできる。例えば、アスペルギルス属などにおけるプロモーターの中から第1DNA断片及び第2DNA断片に相当する配列を内包するプロモーターを選択し、これを鋳型としたPCR法などを行うことによって、このようなDNA断片を調製することができる。鋳型として用いることができる好適なプロモーターの例としてはアスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼA遺伝子のプロモーター（配列番号12）を挙げることができる。プロモーターの改変に用いられるDNA断片の塩基配列の一例を配列番号9に示す。このDNA断片（CCAAT-SRE断片）はアスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼA遺伝子におけるプロモーター領域の一部（240位～367位（転写開始点を+1として-312位～-185位））である。尚、このDNA断片に一部の改変を施したDNA断片であっても、それが組込まれるプロモーターの活性を高める機能（エンハンサー機能）を有する限りプロモーター領域の改変に利用できる。ここで、一部の改変とはDNA断片を構成する一部の塩基が置換、欠失される場合、又は1～数个の塩基が付加若しくは挿入される場合をいう。このような改変が許容される程度は、改変が行われるDNA断片上の部位によって異なる。エンハンサー機能に重要な部分は第1DNA断片及び第2DNA断片に相当する配列部分であ

るので、当該配列部分の改変の程度は小さいことが好ましい。他方、その他の部分はエンハンサー機能に直接関与しないと予想されることから比較的大きな改変が許容されることが考えられる。例えば、1～20個程度、好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個の塩基の置換、欠失、付加などを行うことができる。尚、このような改変には5'末端、3'末端、又はその他の部位への制限酵素切断配列の導入や、シグナルペプチドをコードする配列の付加などが含まれる。

【0016】

以上の改変プロモーターでは糸状菌で機能するプロモーターに第1 DNA断片及び第2 DNA断片（以下、これらのDNA断片及びこれらを含むDNA断片をまとめて、「エンハンサー機能を有するDNA断片」とも呼称する）が挿入されて改変プロモーターが構築されるが、これらのDNA断片の挿入部位は特に限定されない。但し、改変が施されるプロモーターとしてCCAAT配列及びSREを有するものを採用する場合にはこれら二つの配列の間以外の部位に挿入することが好ましい。即ち、CCAAT配列よりも5'末端側の部位又はSREよりも3'末端側の部位にエンハンサー機能を有するDNA断片を挿入することが好ましい。

【0017】

糸状菌で機能するプロモーターに複数個の第1 DNA断片及び複数個の第2 DNA断片を挿入して改変プロモーターを作製することもできる。この場合、使用する第1 DNA断片と第2 DNA断片の個数を同じとすることが好ましい。また、一つの第1 DNA断片と一つの第2 DNA断片とが組をなし、かつ各組において第1 DNA断片が5'末端側に位置するようにプロモーターに挿入されることが好ましい。

第1 DNA断片と第2 DNA断片を含むDNA断片を用いる場合においても、これを複数挿入してプロモーターの改変を行ってもよい。この場合においても、改変が施されるプロモーターとしてCCAAT配列及びSREを有するものを採用するときには、これら二つの配列の間以外の部位に当該DNA断片を挿入することが好ましい。

【0018】

複数のエンハンサー機能を有するDNA断片を組込んでプロモーターの改変を行うことにより更なるプロモーター活性の向上が期待できる。

【0019】

改変プロモーターの作製に供される、糸状菌で機能するプロモーターとしては糸状菌で機能するという性質を有する限りその種類は特に限定されない。例えば、アスペルギルス属、ペニシリウム属、トリコデルマ属等の微生物におけるタンパク質をコードする遺伝子のプロモーターを挙げることができる。具体的には、アスペルギルス属の α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ等をコードする遺伝子のプロモーターを用いることができる。中でも、アスペルギルス・オリゼのタカアミラーゼのプロモーターを用いることが好ましい。これらのプロモーターはそれを有する微生物より、制限酵素処理、PCR法などの遺伝子工学的手法を用いて取得することができる。また、目的のプロモーターが組込まれたベクターを利用できる場合には、当該ベクターから制限酵素処理やPCR法などによって取得することができる。

【0020】

本発明の形質転換体を、導入された外来遺伝子を発現可能な条件下で培養することにより目的のタンパク質を産生させることができる。培養用の培地は使用される形質転換体に応じて適切なものが用いられる。例えば市販の各種培地又はこれらにアルギニン、ウリジン等の形質転換体の生育、選択、タンパク質の発現促進などに必要な成分を添加した培地などを用いることができる。

【0021】

所望時間培養した後の培養液又は菌体より目的のタンパク質が回収される。分泌型タンパク質であれば培養液より、それ以外であれば菌体内より回収することができる。培養液からの回収する場合には例えば、培養上清をろ過、遠心処理して不溶物を除去した後、硫酸沈殿等の塩析、透析、各種クロマトグラフィーなどを組み合わせて分離、精製を行うことにより目的のタンパク質を取得することができる。他方菌体内から回収する場合には例えば、菌体を加圧処理、超音波処理などによって破碎した後、上記と同様に分離、精製を行うことにより目的のタンパク質を取得することができる。尚、ろ過、遠心処理などによって予め培養液から菌体を回収した後に上記一連の工程（菌体の破碎、分離、精製）を行ってもよい。

【0022】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例 1】 α -グルコシダーゼB (agdB) の精製と agdB 遺伝子のクローン化
(1-1) α -グルコシダーゼBの精製と酵素学的性質

Aspergillus nidulans ABPU1 (pyrG89, biA1, wA3, argB2, pyroA4 : Mol. Gen. Genet. (1997) 253:520-528, Motoyama, T., M. Fujisawa, N. Kojima, H. Horiuchi, A. Ohta and M. Takagi.) を、炭素源として 2% スターチを含む最小培地 2L に孢子数 10^6 /ml となるように接種し、37℃ で 24 時間振とう培養した。吸引ろ過により菌体を分離し、液体窒素で凍結後、液体窒素存在下で菌体を粉末状に破碎した。菌体湿重量 1g あたり 5ml の抽出バッファー (0.5% Triton X-100, 1mM EDTA, 2mM PMSF を含む 0.2M MES-KOH バッファー, pH 5.5) を加えて懸濁させ、ポリトロンでホモゲナイズした。16,000 x g, 4℃ で 30 分間遠心分離し、得られた上清を細胞抽出液とした。この細胞抽出液より α -グルコシダーゼB を以下のようにして精製した。

【0023】

細胞抽出液を 1mM EDTA, 0.5mM PMSF を含む 20 mM MES-KOH バッファー (pH 5.5) に対して透析した後、あらかじめ 20 mM MES-KOH バッファー (pH 5.5) で平衡化した DEAE-Tyopearl 650M カラム (2.5 x 10 cm) に供した。本カラムに吸着したタンパク質を 200 ml の 0-0.5 M NaCl 直線濃度勾配により溶出した。0.1 M NaCl で溶出された主要な α -グルコシダーゼ活性画分を回収し、1.5 M 硫酸アンモニウムを含む 20 mM MES-KOH バッファー (pH 5.5) に対して透析した。この活性画分を同バッファーで平衡化した Phenyl Sepharose CL-4B カラム (1 x 12 cm) に吸着させ、40 ml の 1.5-0 M 硫酸アンモニウムの直線濃度勾配により溶出した。硫酸アンモニウム 0 M で溶出された活性画分を回収し、20 mM HEPES-KOH バッファー (pH 7.4) に対して透析した後、Centriprep YM-10 で 1 ml に濃縮した。この濃縮サンプルをあらかじめ同バッファーで平衡化した Resource Q カラムに供した。Resource Q カラムクロマトグラフィーは AKTA explorer 10S システムを使用して行った。本カラムに吸着したタンパク質は 60 ml の 0-1 M NaCl 直線濃度勾配により

溶出した。塩濃度0.3 Mで溶出された活性画分を20 mM HEPES-KOHバッファ（pH 7.4）に対して透析し、精製酵素とした。

【0024】

本精製酵素は74 kDaと54 kDaのサブユニットで構成され、至適pHは5.5、pH安定性はpH 5.0からpH8.5の間、また温度安定性は45℃までは酵素活性を90%以上保持しており、pH 4.0 以下、pH 11.0 以上、60℃以上で完全に酵素活性が失われた。

本酵素は分解活性に加えて位置選択的に α -1, 6グルコシド結合を形成する糖転移活性を有している。マルトオリゴ糖に対して高い加水分解活性を示し、マルトトリオースに対して最も高い反応性を示し、マルトテトラオース、マルトペンタオースの順に反応性が低下することから、重合度の高いマルトオリゴ糖に反応性が低いことが示唆された。また、本酵素はイソマルトース、ニゲロース、コージビオース、 α 、 α -トレハロースに対しても加水分解活性を示した。しかし、p-ニトロフェニルグルコシドおよびショ糖、スターチに対してほとんど活性を示さなかった。また、本酵素の糖転移活性により、マルトースからグルコースと複数の糖転移産物が合成された。その主要な糖転移産物はイソマルトースとパノースであった。反応開始から6時間で、基質として加えたマルトースの約50 %に相当する量の糖転移産物が生成し、そのうちの60 %がイソマルトースであった。また、コージビオース、ニゲロースを基質にした場合はイソマルトースが生成し、イソマルトースを基質にした場合はイソマルトトリオースが生成した。

【0025】

(1-2) α -グルコシダーゼB遺伝子のクローン化

上記精製酵素標品をSDS-PAGEに供し、74 kDa及び55 kDaの各サブユニットを分離し、電気泳動的にSequi-Blot PVDF膜に転写した。74 kDa及び55 kDaの各サブユニットに相当するバンドを膜より切り出し、Applied Biosystems model 473A プロテインシーケンサーによりN末端アミノ酸配列を決定した。74 kDa及び55 kDaの各サブユニットのN末端アミノ酸配列はそれぞれSQAGVDPLDRPGNDYVKD及びQSHRQLGAGRWRSAVRHであった。また、74 kDa及び55 kDaの各サブユニットの内部アミノ酸配列を決定するために、精製酵素をSDS-PAGEに供し、両サブユニットを分

離し、それぞれをアクリルアミドから電気溶出した。各サブユニットをリジルエンドペプチダーゼで分解し、得られたペプチドを15% SDS-PAGEにより分画し、電気泳動的にPVDF膜へ転写した。それぞれの主要なバンドについてプロテインシーケンサーによりN末端アミノ酸配列を決定した。74 kDaサブユニットに由来する主要ペプチド (30 kDa) 及び55 kDaサブユニットに由来する主要ペプチド (15 kDa) のN末端アミノ酸配列はそれぞれTHLPQNPHLYGLGE及びDVSHWLGDNISDWLSYRLSIであった。

【0026】

74 kDaサブユニットのN末端および内部アミノ酸配列に基づいて、N末端のプライマーN1 (5' -ARGCNGGNGTIGAYCCIIYTNGA-3'), N2 (5' -YTNGAYMGICCNNGGIAAYGA-3') および内部アミノ酸配列に相当するプライマーI1 (5' -CCRTANARRTGIGGRTTYTGNGG-3'), I2 (5' -TGIGGRTTYTGNGGIARRTGNGT-3') を設計し、PCR反応に供した。A.nidulans染色体DNAを鋳型にプライマーN1, I1を用いてPCR反応を行った。PCR反応物の一部とプライマーN2, I2を用いて再度PCR反応を行い、agdB遺伝子の一部 (440bp) のDNA断片を増幅した。A.nidulans染色体DNAをHindIIIで消化し、HindIII消化DNA断片をアガロース電気泳動で大きさにより分画した。上述した440bpDNA断片とハイブリダイズする5-7 kbのDNA断片をpBluescript II KS+ (STRATAGENE社) に連結し、大腸菌JM109 (STRATAGENE社) を形質転換した。次に、440bpDNA断片とハイブリダイズする形質転換株を取得した。本形質転換株はagdB遺伝子を含む5.6 kbのHindIIIDNA断片を保持していた。このプラスミドをpGBH6と命名した。クローン化したDNA断片の塩基配列はLI-COR model 4000 DNA sequencerを使用してSangerらの方法で決定した。agdB遺伝子は57-72 bpの3つの短いイントロンを含む3,055 bpからなり、995アミノ酸残基をコードしている。本遺伝子の塩基配列 (配列番号27) はDDBJ/EMBL/GenBankに登録した。そのaccession number はAB057788である。化学的に決定した74 kDa及び55 kDaの各サブユニットのN末端アミノ酸配列は、推定アミノ酸配列の21から39番目、515から531番目までのアミノ酸配列と一致し、また、両サブユニットの内部アミノ酸配列もそれぞれ167から187番目、637から656番目までのアミノ酸配列と一致していた。この結果は α -グルコシダーゼBが1本のポリペプチド前駆体として合成され、プロセシ

ングを受けてヘテロ二量体構造をとることを示している。N末端から20番目までのアミノ酸配列はシグナルペプチドの典型的な特徴を有しており、本酵素は分泌性酵素であることを示唆している。

【0027】

[実施例2] 改変プロモーターの作製

(2-1) プロモーター領域のサブクローニング

アスペルギルス・オリゼJCM02239株のタカアミラーゼA遺伝子 (taaG2) 3164bp [Gene, 84, 319-327(1989)] を含むpTG-taa [Mol. Gene. Genet., 254, 119-126(1997)] を出発材料としてタカアミラーゼA遺伝子プロモーター領域およびタカアミラーゼA遺伝子のコーディング領域を調製した。

まず、pTG-taaからタカアミラーゼA(taaG2)プロモーター領域を含む750bpのEcoRI-SalI断片を取得し、この断片をプラスミドpKF18K (東洋紡績株式会社) のマルチクローニングサイトのEcoRI-SalI部位に挿入してタカアミラーゼプロモーターを含むプラスミドpKF-taaPを取得した。プロモーター領域への変異導入操作および改変プロモーター領域の構築はこのプラスミドを用いて行った。

【0028】

(2-2) 転写制御因子結合配列を含むDNA断片の取得

既に報告されている広域転写活性化因子 (HAP) の結合因子であるCCAAT配列 [Mol. Gen. Genet., 237, 251-260(1993)] およびデンプン分解酵素遺伝子群の転写活性化因子 (AmyR) の結合因子SRE [Mol. Gen. Genet., 262, 668-676(1999)] を含む断片を次の様に取得した。

まず、CCAAT配列の5'末端側にXhoI部位を、3'末端側にNotI部位を付加した合成DNAとしてXNF (5'-CCGCTCGAGGCACCATCCAATTAGAAGCGCGCCGCTAAACTAT-3' : 配列番号13) と、この配列の相補鎖としてXNR (5'-ATAGTTTAGCGCCGCGCTTCTAAT TGGATGGTGCCTCGAGCGG-3' : 配列番号14) を合成し、続いてこれら合成DNAの相補鎖同士を混合して98℃10分間加熱後、2時間かけて30℃まで冷却し、その後4℃まで冷却してアニーリングさせることによってCCAAT配列を単独で含むDNA断片を取得した。

【0029】

一方、SREの5'末端側と3'末端側にSpeI部位およびHincII部位を付加した合成DNAとしてSREf (5'-GACTAGTTAACCTAGGGGCGGAAATTTAACGGGATGTAACTAGTC-3': 配列番号15)と、この配列の相補鎖としてSREr (5'-GACTAGTTAACATCCCGTTAAATTCCGCCCCTAGGTAACTAGTC-3': 配列番号16)を合成し、上記と同様の方法でSREを単独で含むDNA断片を取得した。以後、ここで作製したCCAAT配列のみを含むDNA断片を「CCAAT断片」、SREのみを含むDNA断片を「SRE断片」とそれぞれ呼ぶことにする。

【0030】

次に、CCAAT配列からSREまでの領域を含むDNA断片（配列番号9。以下、「CCAAT-SRE断片」という）を、以下のプライマーおよび鋳型として（2-1）で調製したpKF-*taaP*を用いて、94℃ 30秒、54℃ 30秒、72℃ 1分30秒を1サイクルとして30サイクルのPCR反応を行うことによって取得した。尚、PstIサイトを含む断片（配列番号10。以下、「CCAAT-SRE(PstI)断片」という）とXhoI-NotIサイトを含む断片（配列番号11。以下、「CCAAT-SRE(XhoI-NotI)断片」という）の2種類を作製した。

【0031】

PstIサイトを付加した上流プライマー、

CSPf: 5'-AAACTGCAGACCACCTCTAGGCATCGGACG-3'（配列番号17）

PstIサイトを付加した下流プライマー、

CSPr: 5'-TTTCTGCAGTGTGATTTGTGGTTGAGTGG-3'（配列番号18）

XhoIサイトを付加した上流プライマー、

CSXf: 5'-CGGCTCGAGGCATCGGACGCACCATCC-3'（配列番号19）

NotIサイトを付加した下流プライマー、

CSNr: 5'-ATAGTTTAGCGGCCCGCGACTGTGATTTGTGGTTGAGTGG-3'（配列番号20）

【0032】

（2-3）改変プロモーターを含むプラスミドの構築

タカアミラーゼA遺伝子プロモーター領域への変異導入を次のように行った。まず、（2-1）で調製したpKF-*taaP*へプロモーター領域改変用の制限酵素サイトを導入するために、以下に示すプライマーおよびMutan-Super Express Km Kit

(TAKARA社) を用いてpKF-*taaP*に対する部位特異的変異導入を行った。なお、野生型プロモーターの配列(配列番号 1 2)を図 1 に示し、導入した制限酵素サイトの位置を図 2 に示した。

【 0 0 3 3 】

下流域(配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置465)へのNotIサイト導入用のプライマー、

Not-b: 5'-CGCTTGGATTCCCCGCGCGCCGCGAGCTTAAAGTATGTCCC-3' (配列番号 2 1)

下流域(配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置440)へのXhoIサイト導入用のプライマー、

Xho-b; 5'-GAATGCAATTTAAACTCTTCCTCGAGTCGCTTGGATTCCCCGCCC-3' (配列番号 2 2)

【 0 0 3 4 】

上流域(配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置153)へのNotIサイト導入用のプライマー、

Not-a: 5'-GTAGTAAAACCCCGGAGTCAGCGGCCGCAAGCCCAAGTCCTTCACG-3' (配列番号 2 3)

上流域(配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置128)へのXhoIサイト導入用のプライマー、

Xho-a: 5'-CGTCAAGGGATGCAAGACTCGAGTAGTAAAACCCCGGAGTC-3' (配列番号 2 4)

【 0 0 3 5 】

CCAAT配列とSREに挟まれた領域(配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置252)へのNotIサイト導入用のプライマー、

Not: 5'-GCACCATCCAATTAGAAGCGCGGCCGCGAAACAGCCCAAGAAAAAGG-3' (配列番号 2 5)

下流域(配列番号 1 2 に示すタカアミラーゼプロモーターの存在位置490)へのSpeIサイト導入用のプライマー、

STATA: 5'-TAAAGTATGTCACTAGTCGATGCGAT-3' (配列番号 2 6)

【 0 0 3 6 】

次に、(2-2) で調製したCCAAT断片をXhoIおよびNotIで切断し、アガロースゲル電気泳動に供して回収・精製した。得られたDNA断片を上記のようにしてプロモーター下流域に導入したXhoI-NotI部位に挿入し、改変プロモーターPCCAA Tbを含むプラスミドpKF-CCAATbを作製した。同様に(2-2) で調製したSRE断片をHincIIで切断して得られるDNA断片がプロモーター下流域のXhoI-NotI部位に挿入された改変プロモーターPSREbを含むプラスミドpKF-SREb、(2-2) で調製したCCAAT-SRE(PstI)断片をPstIで切断して得られるDNA断片がプロモーター下流域のPstI部位に挿入された改変プロモーターPCSPを含むプラスミドpKF-PCSP、(2-2) で調製したCCAAT-SRE(XhoI-NotI)断片をXhoI、NotIで切断して得られるDNA断片がプロモーター下流域のXhoI-NotI部位に挿入された改変プロモーターPCSbを含むプラスミドpKF-PCSbをそれぞれ作製した。また、CCAAT-SRE(XhoI-NotI)断片をXhoI、NotIで切断し、回収・精製した断片をプロモーター下流域のXhoI-NotI部位に挿入し、その後、CCAAT-SRE(PstI)断片をPstI部位に挿入することにより、2箇所CCAAT-SRE断片が挿入された改変プロモーターPCSPbを含むプラスミドpKF-PCSPbを作製した。

【0037】

[実施例3] アミラーゼ遺伝子発現ベクターの構築

アミラーゼ遺伝子発現ベクターの作製過程を図3に示す。まず、プラスミドpUC18(東洋紡績株式会社)をSalIで消化後、Klenow処理によって平滑末端化し、セルフライゲーションすることによってSalI部位の欠失したプラスミドpUC18(S-)を取得した。一方、プラスミドpTG-*taa*よりタカアミラーゼA遺伝子のEcoRI断片を単離し、この断片をpUC18(S-)のマルチクローニングサイトのEcoRI部位に挿入してpUC-*taa*(S-)を取得した。このプラスミドpUC-*taa*(S-)をEcoRIで部分分解し、*taaG2*遺伝子の3'末端側のEcoRIサイトが欠失したプラスミドpUC-*taa*を取得した。同様にして、pBluescriptII KS(+)のXhoI、SalI、BamHIを欠失させたプラスミドpBlue(XSE-)を取得した。

【0038】

次に、pUC-*taa*から*taaG2*を含むEcoRI-HindIII断片を単離して、この断片をプラスミドpBlue(XSE-)のマルチクローニングサイトのEcoRI-HindIII部位に挿入し

て、*taaG2*を含むプラスミドpBlue-*taa*を取得した。

続いて、(2-3) で得られた改変プロモーターを含むプラスミドpKF-*taa*PM シリーズ (pKF-CCAATb、pKF-SREb、pKF-PCSP、pKF-PCSb、またはpKF-PCSPb) から改変プロモーター領域のEcoRI-SalI断片を単離して、プラスミドpBlue-*taa*のマルチクローニングサイトのEcoRI-SalIに挿入し、改変プロモーター領域と*taaG2*遺伝子が連結したプラスミドpBlue-*taaM*を取得した。pBlue-*taaM*から改変プロモーターを含んだ*taaG2*遺伝子のXbaI-BamHI断片を単離し、プラスミドpBAR7 (pBluescriptII KS(+)) にアスペルギルス・ニドランス由来のC末が欠失した*argB*遺伝子が挿入されたプラスミド) のマルチクローニングサイトのXbaI-BamHIに組み込み、プロモーター活性測定用プラスミドpBAR-*taaM*シリーズ (pBAR-CCAATb、pBAR-SREb、pBAR-PCSP、pBAR-PCSb、及びpBAR-PCSPb) とした。尚、野生型プロモーターを有するプラスミドを同様の手順で作製し、これをpBAR-*taa*とした。

【0039】

[実施例4] α -グルコシダーゼB欠損株を宿主とした形質転換体の取得

(4-1) α -グルコシダーゼB (*agdB*) 遺伝子破壊株の構築

(1-2) で得られたプラスミドpGBH6に含まれる*agdB*遺伝子の一部 (4.9 kb) のSacI断片 (-3,132から+1,689) をpBluescriptII KS(+) にサブクローン化してpGBS5を構築した。pGBH6のClaI-HindIII 4.9 kb断片 (+222から+4,726) とpGBS5から調製したApaI-ClaI 3.1 kb断片 (-2,834から+221) をApaI、ClaI消化したpBluescript IIKS+に連結してpGBA8を構築した。*agdB*遺伝子破壊用プラスミドpGB Δ P2は、pGBA8のSalI断片 (*agdB*遺伝子の-181から+3,435に相当) を*N. crassa* *pyr4*遺伝子を含むBspI 2.0 kb断片と置換して構築した。なお、BspI 2.0 kb断片は*pyr4*遺伝子を含むpTG1 (Mol. Gen. Genet. (1997) 254:119-126, M. Kato, A. Aoyama, F. Naruse, T. Kobayashi, and N. Tsukagoshi) より調製した。次にpGB Δ P2から破壊された*agdB*遺伝子を含む5.9 kb KpnI-SpeI断片を調製し、*A. nidulans* AB PU1を形質転換して Δ *agdB*株DBP9を得た。*agdB*部位に*pyr4*遺伝子が挿入されていることはサザンブロット解析により確認した。尚、この菌株は以下のとおり寄託されている。

受託番号: FERM P-19070

国際寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番3号 中央第6

寄託日：2002年（平成14年）10月18日

【0040】

（4-2）形質転換

糸状菌の形質転換を次のように行った。まず、実施例3で得られたpBAR-*taa*、pBAR-PCSB、pBAR-PCSPbの各プラスミドをEcoRVで消化後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿の操作を行い、精製したプラスミドを形質転換に用いた。形質転換は次のように行った。（4-1）で得られたアスペルギルス・ニドランスの α -グルコシダーゼ欠損株DBP9 ((*pyrG89*) *biA1* *wA3* *argB2* *pyroA4* Δ *agdB::pyr4*) と、コントロール株としてアスペルギルス・ニドランス ABPU1 株 (*biA1* *pyrG89* *wA3* *argB2* *pyroA4*) をコンプリート培地（2% マルトエキス、2% グルコース、0.1% バクトペプトン）に必要な栄養源（アルギニン、ウリジン、ピリドキシン、及びビオチン）を添加した培地で、37℃、一晩振とう培養した後、得られた菌体を細胞壁溶解液〔20 mg/ml Yatalase（宝酒造社）, 0.8 M NaCl, 10 mM リン酸緩衝液（pH6.0）〕に懸濁し、30℃で1～2時間緩やかに振とうすることによりプロトプラスト化した。得られたプロトプラストをナイロンフィルターで濾過することにより、残存する菌体を除去した。次にこのプロトプラスト及び上記精製した各プラスミドを用いて、Turnerらの方法〔Gene, 36, 321-331(1985)〕により形質転換を行い、アルギニンを含まない培地（ツァペック・ドックス培地（0.2% NaNO₃、0.1% K₂HPO₄、0.05% KCl、0.05% MgSO₄・7H₂O、2% グルコース（pH5.5））にウリジン、ピリドキシン、及びビオチンを添加した培地）で生育可能な形質転換体をそれぞれのプラスミドにつき、20から40株ずつ取得した。

【0041】

（4-3）サザンプロット解析による形質転換体の選択

各形質転換株から染色体DNAを次のように調製した。まず、形質転換株をコンプリート培地に必要な栄養源（ウリジン、ピリドキシン、及びビオチン）を添加した培地で37℃、一晩振とう培養後、得られた菌体をブフナー漏斗とNo.2のろ紙

(アドバンテック社) で集めて滅菌水で洗浄した。余分な水分を除去したあと、 -80°C で凍結し、FREEZONE (LABCONCO社) を用いて乾燥させた。乾燥後、1mm のガラス玉を加えて、マルチビーズショッカー (安井器械社) を用いて 2000rpm、5 分間破碎して微粉末状にし、この菌体破碎物に抽出溶液 [1% ヘキサデシルメチルアンモニウムブロマイド、0.7M NaCl、50mM Tris-HCl、10mM EDTA、1% β -メルカプトエタノール] を加えて攪拌後、室温で 30 分間放置した。得られた溶菌液をフェノール/クロロホルム抽出して、夾雑するタンパク質を除去後、等量のイソプロパノールを加えて、DNA を沈殿させた。この沈殿物を 0.1mg/ml の RNase を含む TE 溶液に溶解して、 37°C 、30 分間反応させた後、さらに 0.2mg/ml の proteinase K を含む TE 溶液を加え、 37°C 、30 分間反応させた。この溶液をフェノール/クロロホルム抽出した後、2.5 倍容の冷エタノールで沈殿させた。この沈殿物を 70% エタノールでリンスして乾燥後、TE 溶液に溶解したものを染色体 DNA 溶液とした。

【0042】

サザンブロット解析は、染色体 DNA を PvuII あるいは EcoRV で消化後、アガロースゲル電気泳動で分離してナイロンメンブレン (ロシュ社) にブロットした後、taaG2 の約 1000bp の BglIII-SmaI 消化物をプローブとして検出した。このとき、プローブのラベリングおよびシグナルの検出は DIG 核酸検出キット (ロシュ社) を用いて行った。

【0043】

サザンブロット解析の結果より、宿主として用いた菌株のアミラーゼ生産能の比較に適した形質転換体、即ちプラスミドが argB 座位へ相同的に 1 コピー組み込まれた株で、染色体に組み込まれるときの位置による影響と、導入される遺伝子のコピー数の影響を受けずにアミラーゼ生産能を比較できる形質転換体を、使用したプラスミドにつき、任意に 2 株以上選択した。

【0044】

[実施例 5] アミラーゼ活性の比較

実施例 4 で得られた、pBAR-*taa*、pBAR-PCSB、及び pBAR-PCSPb がそれぞれ組み込まれた各形質転換体を用いて、 α -グルコシダーゼ B 欠損株を宿主とした場合と ABPU1 株を宿主とした場合のアミラーゼ生産性を以下の手順で比較した。

まず、各形質転換体を最少培地 (0.9% NaNO_3 、0.05% KCl 、0.15% KH_2PO_4 、0.15% Trace element、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1% グルコース (pH6.5)) に必要な栄養源 (ウリジン、ピリドキシン、及びビオチン) を添加した寒天培地に放射状に植菌し、37℃、3日間培養した後、この寒天培地から分生胞子を胞子懸濁用溶液 (0.01% tween80、0.8% NaCl) に懸濁して綿で濾過し、胞子懸濁液を調製した。この胞子懸濁液から、分生胞子 1×10^8 個を SP 培地 (1% Starch、1% poly peptone、0.5% KH_2PO_4 、0.1% NaNO_3 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH6.5)) または MP 培地 (1% Maltose、1% polypeptone、0.5% KH_2PO_4 、0.1% NaNO_3 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH6.5)) にアルギニン以外の必要な栄養源 (ウリジン、ピリドキシン、及びビオチン) を添加した培地 100ml に接種し、37℃、36時間振とう培養後、ブフナー漏斗とろ紙で菌体と上清を分離して、上清を酵素溶液とした。

【0045】

アミラーゼ活性は 20mM 酢酸ナトリウム buffer、10mM CaCl_2 、2% Soluble Starch (ナカライテスク社) に酵素溶液を加えて 150 μl の反応系を調製し、これを 37℃ で 20 分間反応させて生成した還元糖量を Nelson-Somogyi 法により定量した。また、1 分間に 1 μmol のグルコースを遊離する酵素量を 1 unit とした。次に、測定したアミラーゼ活性値からアミラーゼ生産量を求めて、 α -グルコシダーゼ B 欠損株を宿主とした場合と、ABPU1 株を宿主とした場合のアミラーゼ生産性を比較した。

【0046】

アミラーゼ活性測定の結果を図 4 に示す。 $\Delta agdB$ 株を宿主とした taaG2 遺伝子の形質転換体を、デンプンを C 源とする培地で培養したときのアミラーゼ生産量は、ABPU1 株を宿主としたときの約 6 倍の生産量であった。これは、 α -グルコシダーゼ B が欠損していることにより、誘導物質であるイソマルトースの分解が抑えられ、誘導効果が持続することに因ると考えられる。この結果から、 α -グルコシダーゼ B の欠損が、アミラーゼ生産能の増強に非常に有効であることが確認できた。

【0047】

次に、マルトースを C 源とする MP 培地で培養した時のアミラーゼ活性を測定した。 $\Delta agdB$ 株を宿主とした taaG2 遺伝子の形質転換体を用いた場合のアミラーゼ

生産量は、ABPU1株を宿主としたときの約7倍であり、 $\Delta agdB$ 株を宿主として改変プロモーター（PCSB又はPCSPb）を組み込んだ株のアミラーゼ生産量は、ABPU1株を宿主としたときの約2倍の生産量であった。この結果から、イソマルトースを合成しやすいマルトースなどのC源を培地に利用した場合には、 $agdB$ 遺伝子を欠損した宿主を用いることにより、アミラーゼ生産能を一層増強できることが分った。また改変プロモーターを用いることによりさらに高い生産性が得られることが明らかとなった。尚、図4の表に示されるように、本実施例の系においては最高で1g/Lのアミラーゼの生産が認められた。

【0048】

本出願は文部科学省の科学技術振興調整費による委託業務として実施した平成14年度「カビの酵素高生産能を利用した環境調和型工業プロセス技術の基盤研究」の成果である。

【0049】

【発明の効果】

本発明により、遺伝子を外来的に導入した際に当該遺伝子の発現を効率的に高めることが可能な宿主微生物が提供される。目的タンパク質をコードする遺伝子を当該宿主微生物に導入して得られる形質転換体を用いれば、目的タンパク質を高い生産性で生産することができる。

【0050】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> AMANO ENZYME INC.

<120> Microorganism in which an isomaltose-producing enzyme
is deleted

<130> P02-661

<140>

<141>

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 1

ccaatnnnnn n

11

<210> 2

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 2

cggnnnnnnn nngg

14

<210> 3

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 3

ccaattagaa g

11

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 4

cgghnwwwn whgg

14

<210> 5

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 5

cggwwwww whgg

14

<210> 6

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 6

cggaattta aagg

14

<210> 7

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 7

cggaatttaa acgg

14

<210> 8

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an enhancer
sequence

<400> 8

cggaattta acgg

14

<210> 9

<211> 128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a DNA fragment
including CCAAT sequence and SRE

<400> 9

ccaattagaa gcagcaaagc gaaacagccc aagaaaaagg tcggcccgtc ggccttttct 60
gcaacgtga tcacgggcag cgatccaacc aacaccctcc agagtgacta ggggcggaaa 120
tttaaagg 128

<210> 10

<211> 196

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a DNA fragment
including CCAAT sequence and SRE

<400> 10

ctgcagacca cctctaggca tcggacgcac catccaatta gaagcagcaa agcgaaacag 60
cccaagaaaa aggtcggccc gtcggccttt tctgcaacgc tgatcacggg cagcgatcca 120
accaacaccc tccagagtga ctaggggcgg aaatttaaag ggattaattt ccactcaacc 180
acaaatcaca ctgcag 196

<210> 11

<211> 193

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a DNA fragment
including CCAAT sequence and SRE

<400> 11

ctcgagaggc atcggacgca ccatccaatt agaagcagca aagcgaaaca gcccaagaaa 60
aaggtcggcc cgtcggcctt ttctgcaacg ctgatcacgg gcagcgatcc aaccaacacc 120
ctccagagtg actaggggcg gaaatttaaa gggattaatt tccactcaac caciaatcac 180

agtcggcggc cgc

193

<210> 12

<211> 615

<212> DNA

<213> Aspergillus oryzae

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(615)

<400> 12

gaattcatgg tgttttgatac atttttaaatt tttatatggc ggggtggtggg caactcgctt 60
ccgggcaact cgcttaccga ttacgttagg gctgatattt acgtaaaaat cgtcaaggga 120
tgcaagacca aagtagtaaa accccggagt caacagcatc caagccaag tccttcacgg 180
agaaacccca gcgtccacat cacgagcgaa ggaccacctc taggcatcgg acgcaccatc 240
caattagaag cagcaaagcg aaacagccca agaaaaaggt cggcccgtcg gccttttctg 300
caacgctgat cacgggcagc gatccaacca acaccctcca gagtgactag gggcggaat 360
ttaaagggat taatttcac tcaaccacaa atcacagtcg tccccggtat tgtcctgcag 420
aatgcaattt aaactcttct gcgaatcgct tggattcccc gccctggcc gtagagctta 480
aagtatgtcc cttgtcgatg cgatgtatca caacatataa atactagcaa gggatgccat 540
gcttggagga tagcaaccga caacatcaca tcaagctctc ccttctctga acaataaacc 600
ccacagaagg cattt 615

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying CCAAT sequence

<400> 13

ccgctcgagg caccatccaa ttagaagcgc ggccgctaaa ctat

44

<210> 14

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying CCAAT sequence

<400> 14

atagtttagc ggccgcgctt ctaattggat ggtgcctcga gcgg

44

<210> 15

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying SRE

<400> 15

gactagttaa cctaggggcg gaaatttaac gggatgttaa ctagtc

46

<210> 16

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer

designed for amplifying SRE

<400> 16

gactagttaa catcccgta aatttccgcc ctaggttaa ctagtc

46

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying a DNA fragment including
CCAAT sequence and SRE

<400> 17

aaactgcaga ccacctctag gcatcggacg

30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying a DNA fragment including
CCAAT sequence and SRE

<400> 18

tttctgcagt gttgatttgt ggttgagtgg

30

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying a DNA fragment including
CCAAT sequence and SRE

<400> 19

cggctcgagg catcgacgc accatcc

27

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a PCR primer
designed for amplifying a DNA fragment including
CCAAT sequence and SRE

<400> 20

atagtttagc ggccgccgac tgtgatttgt ggttgagtgg

40

<210> 21

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 21

cgcttgatt ccccgccgc ggccgcagag cttaaagtat gtccc

45

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 22

gaatgcaatt taaactcttc ctcgagtcgc ttggattccc cgccc 45

<210> 23

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 23

gtagtaaaac cccggagtca gcggccgccca agcccaagtc cttcacg 47

<210> 24

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 24

cgtcaaggga tgcaagactc gagtagtaaa accccggagt c 41

<210> 25

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 25

gcaccatcca attagaagcg cggccgcgaa acagcccaag aaaaagg 47

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:a primer for
site-directed mutagenesis

<400> 26

taaagtatgt cactagtcga tgcgat 26

<210> 27

<211> 5640

<212> DNA

<213> Aspergillus nidulans

<400> 27

aagcttggtg aagccgtcaa tccgcagcct atctggttga gttcgccggt caaccgtact 60
gaaagtagca ttgaggggca gaacttattc gtttcgagac agcaatgaat tctcaagtga 120
cacctatata tgcccagctg ttgtctcttc attcttcttt ggaccaagtt tttactggag 180

tacaatgacc ctgtaatcct accgggtggg cctgatctgg ccgtcggaga acgtagggtt 240
tccctactgc cctactgccc tttagtaggc cattatcctg tccaccacct ttcgcttccg 300
gcttttcttt ctttcatact ttgcttttct ccttgaaatt gtttacttct accattgtct 360
atcagtttct tgttaagcca cctctgggtct cccgggtggg tatgggcca tccaatttc 420
gcagtcttgg cacttttact cgaagatgag ggaaggtaaa tcaggctcag cctcattgag 480
cgataggccg ccaattctca acctagcgag tacgagctta agcagtttgg cggagcccct 540
gttctagaag ctgtccagct cgggtgtcctg tatcatgaag cgcattcgat cgcttggctg 600
gcgtcagggt tcgtccaacg gcactgaatc cacgatcact actgggtaaa caccgccaa 660
gcgcctgggc agcgaccaag gtacggaagg tccgggcttt caaaaattac cgcgggacta 720
ctccggagtc gaccgttaag cagggtcgat gattgggtag tgctggcgaa gcgttgcat 780
tgctcgggct tttagcgag actgcggagt cccaattct tggcagtcca tgaagcgag 840
tataaaaggc gtccggcaag aagatagagt atcctgtaga ccagctcttc ctcactttgt 900
ggagtcaaga tgcgctttca gcagctgctt ccatgggctg cggccctgac tggctgcgtc 960
gtcgcccaga gccaggccgg cgtcgatccg ctcgaccgtc ccggcaatga cctctacgta 1020
aaggacctt cgaactgcac tgggtacaag gtcaccaagc attggaagac ccgatccgt 1080
ttctatgcgg acctggcgct cgccgggcca gcatgcaatg tgtacggaat cgatttgccc 1140
aagctgaagc tcgaagtcga gtatcagacc gatgagcgac tgcacgtcaa gattctggat 1200
accaacaaca cagtttacca ggtgccagac agcgtcttcc cgcgcccggg cttcggccag 1260
tgggtgctgc ccaagaactc taagctcaag tttagactca aacctgacct gttctcgttc 1320
accgtctctc gcacagacac cggcgaggtg ctcttcgaca ccaccggcac caagctcgtg 1380
ttcgagaacc agtatcttta tctgaagacg cacctgccgc agaaccgca tctgtatggt 1440
ctgggagagc atagcgactc cttcatgctc aacaccacca actacacccg aacaatctac 1500
acctgtgatg cttacgggac gcccgaaggc cagaatctgt acggggctca cccgatctat 1560
ttcgatcacc ggcaggacgg cactcacggt gtgttcctgc tcaactcaa cggtatggac 1620
atctacatcg acaacgaggg cgccagttc ctcgagtaca acatcatcgg cggcgttttc 1680
gatttctact tcatcgccgg accatccccg caagatgtgg ccaggcagta tgctgaaatt 1740
gtccagccgc ccctgatggt tccatactgg ggactcgtt tccaccagtg caggtaggc 1800
taccaggatg tctacgaggt ggccgtgtc accgccaact actccgtcca cgatatccca 1860
ctggagacca tctggactga tatcgactac atggaccgtc ggcgcattct cacgctcgat 1920

cccgaacgat tcccaccaga gctgggtcaaa gaccttgtgg acactcttca cgcgcgagat 1980
cagcattaca ttgtcatggt tgatccggct gtctactaca gcgagccaaa cccggcgctt 2040
gacgccggtc tgaagtacga tgcgttcatg aaggaactga acggcactca ttaccagggt 2100
gtcgtttggg ccggtcccag ttacttcct gactggtttc acccgaacgc tcaggaatac 2160
tggacggagc agttcctcaa cttcttcgac ggcgtaacg gcccggacat tgatgccctg 2220
tggatcgaca tgaatgagcc cgccaacttt tataaccgcc cctaccagg caacaacacc 2280
accccgagg agtttgccga ggcgatgac aacccccctg agccaccggc cgtgaggggac 2340
gggccagatg cccctatccc cgggttcccg gatagtctcc agccaaactt cgcttctggc 2400
cagacaaacg agaagcgcgc agttgtcacc gtcgaacgtc gggctcggtc tcaatcgac 2460
cgccagctcg gcgctggccg ctggcggtct gcagtccgcc actggccgcg agacccaaag 2520
gctggctggc agcacggccg caaatccggc tctggctgcg gccccacga gtgcagaggt 2580
ctgccaacc gcgagctcat caggccgccg tatatgattc agaacggcgc cggccaacg 2640
ctggcggaca aactgcgga cacggatatc gtgcaaagcg gcggatacgt ccagtacgac 2700
acgcacagcc ttacggcgc gatgatgtcc actcattcgc acaatgccat gcgggctaga 2760
cgtcccgatg accgcgcatt ggtgatcacc aggagcacat ttgccggctc tggaaaggat 2820
gtctcgact ggcttggagg taaggaattc ctgcaatcta aatttgcggc aagggggaac 2880
agctgctgac tagccctact tttctctgca gataacatct ccgattggct ttcataccga 2940
ctgtccatct cccagattct ccagttcgcc tcgctctacc agatccccgt tgteggccct 3000
gatgtctgcg gcttcggtgg aaacgtaact gagaccctct gtgccaggta cgatcgccct 3060
aactcgacag catcttacgt gcctgctaac atagtctcta ctagatgggc taccctcggc 3120
tccttctaca ctttcttcg caaccacgcc gagatctttg ccaatccca agagtcttac 3180
cgggtggccga tcgtcgccga agcggccgc aacggcattg ccattcgata ccagctgcgt 3240
aagtctgcgt tcaccattag atcccaacat aattaacatt gagtcgcca atctagtga 3300
ctacatttac acagccatct acaagcagac ccaaactggc acaccatccc ttaaccgct 3360
cttcttcaac tacccttcg accaaaacac ttacggcatc gatctccagt tcttctatgg 3420
ccccggcatc cttgtctctc cggtcacgga ggaaaacagc accagtgtt cctactacct 3480
tcccagacgac atcttctatg aatggggaac tggcaagccc gtccgcggac acggcgagta 3540
cgtctccgcc gaagtcgacg tcacccatat cacggtgcac tataaggcg gtctcgtcta 3600
tccacagcgg atcgagagcg cgaacaccac aactgcgtg cgccagaagg gattcaatat 3660

cgtcattgca ccgggcttgg atggctctgc tcatggagag ctttaccttg acgatggcct 3720
gtcgcagggtg caggataaag tctccgagat tgacttttagc tatgtcgatg gcgtccttga 3780
gatgaagggc tcgtttgagt atgacccagg cgtcggaatc gagcggatta ctattctggg 3840
tgtggggggcc aagcccaggg tggcggctga ggacgcggag gtcgagtatg atgaggagaa 3900
tcagaagctg gtgctgcacg tcgatgtacc cttgacgcga aagtcaagta tcaagattgc 3960
ttgagtggga gggatggaat gacagggaga ggccatcaag ttgcttgctg cctacttagc 4020
ctagtcaggc ttggacgatt gcgcatacct ctggttaagg cagatgttcc ctgatcagtg 4080
gaggcaacca ttgcccccg ttcacttacc acttgatat gcccattggct ctaataggaa 4140
tacttaatcc taaataatac attattatga caatctccca aaacctatct ccggctgatg 4200
ataacgtgcc tggactccgt gcagctggaa tttgaataca acaaggagca ccgtgaagct 4260
atataagcct agagaaacta taagaatgct ggccttgcta cccttgctc tggtcatagg 4320
tacggactca tgtgctgcta atagtcgact tactcatact tggcgcagat tattcataat 4380
cattgagtac ttactctatc gtaaggttgc tgatggagga cggttggcaa tgtggacgga 4440
gcttagagcg gcatggagaa agagctatct tatactagaa catatacaat ttgaaaaggt 4500
acaataagag gattatacca catttgcgcc ttgctcaata atacttcata ctatgtcctc 4560
ggcagtaggc cggagattaa tcataatata tgcgacagac tattttcgag agagtgtagt 4620
ttgtactcga gaatgacatc tgctttaaaa aaagaaggac ttttctgaca gattagtgcc 4680
gggctactaa aggttctcga gccatatcga gtgtagttgg acgttttaca aatccgtaat 4740
gacgaaaaca cctgcagcaa cagtggatat ggccgtgctg atggagtttt gacgcaaaat 4800
gtctacgagg tatcactaat caatatagat ctcaaattgc ttttgtagcc atgctgtcgg 4860
ataatcctac cgcttagata tcagtaatac gtagccgcgg tagatacaag cgtatattat 4920
gcctgatatac ttaaggctga gaaacctaga aaggacctat tgccaagtta acgcatacag 4980
agaaaaacac gcggattcca ccatgtcaga cagaaagttg atccttgcta tgggaatact 5040
ggcgctcagg gcactcccggt tgtcaagggt acgtcgcatt ccagacggga ttgcgaggaa 5100
cagcagtcta acatggagaa tgatagccct ttcctcaagt ggccgctacg atgtccgagt 5160
actgactcga aataccgcct cagagcaggc taggaaaatg gttgtgctac ctcaggtaac 5220
gctccagcaa ggcttccagg aaaccaggca gatctccacg ctgccttcgc cagcgtatac 5280
ggcgcttga cggctttacg ctcggggaaa aagcgagctg atctacggta tacgagcgta 5340
cgagatcgct cgtcatcatg gcgtcaaaca ctatgttttc gcgaatatcg actatactct 5400

ccgtaaagca ggttgggatg agcagtagca ttgcgcacat tgtgattcca aggcggattg 5460
gtgatctgat cctcaaccat ggccaggagg ggttcacagc tgagaccccg gccaggagtc 5520
ccgtatgatt actgtgctgc tgaccacggg gccgtacatg gatatgctct ttgatggaat 5580
gtttgtccca aaggaaaaga ggatggttca ttgtcttggg agaatccggc tggttaagctt 5640

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1はタカアミラーゼA遺伝子（アスペルギルス・オリゼ）のプロモーター領域の配列を示す図である。

【図2】 図2はタカアミラーゼA遺伝子（アスペルギルス・オリゼ）のプロモーター領域の模式図であり、転写制御因子結合配列（CCAAT配列・SRE）の位置と、変異導入箇所を示す。部位特異的変異によって導入した制限酵素サイトを下線で示す。CCAATはCCAAT配列（広域転写活性化因子（HAP複合体）の結合因子）、SREはデンプン分解酵素遺伝子群の転写活性化因子（AmyR）の結合因子、TATAはTATA-box、+1は転写開始点をそれぞれ表す。

【図3】 図3は実施例3におけるアミラーゼ遺伝子発現ベクターの作製過程を示す図である。

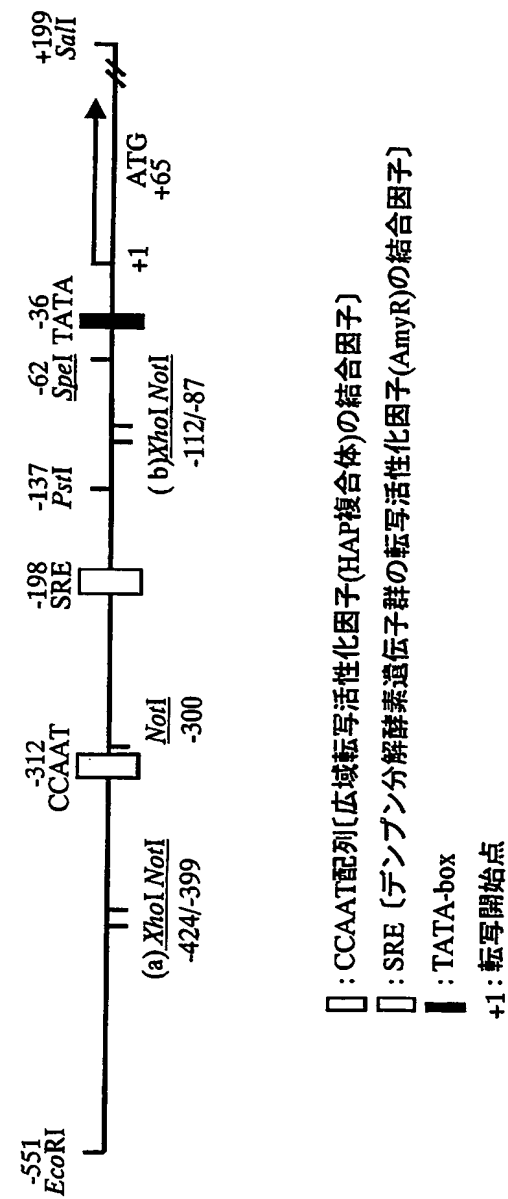
【図4】 図4は実施例4におけるアミラーゼ活性測定の結果をまとめた表である。表中のN.D.はNot Determined（未決定）を表す。

【書類名】 図面

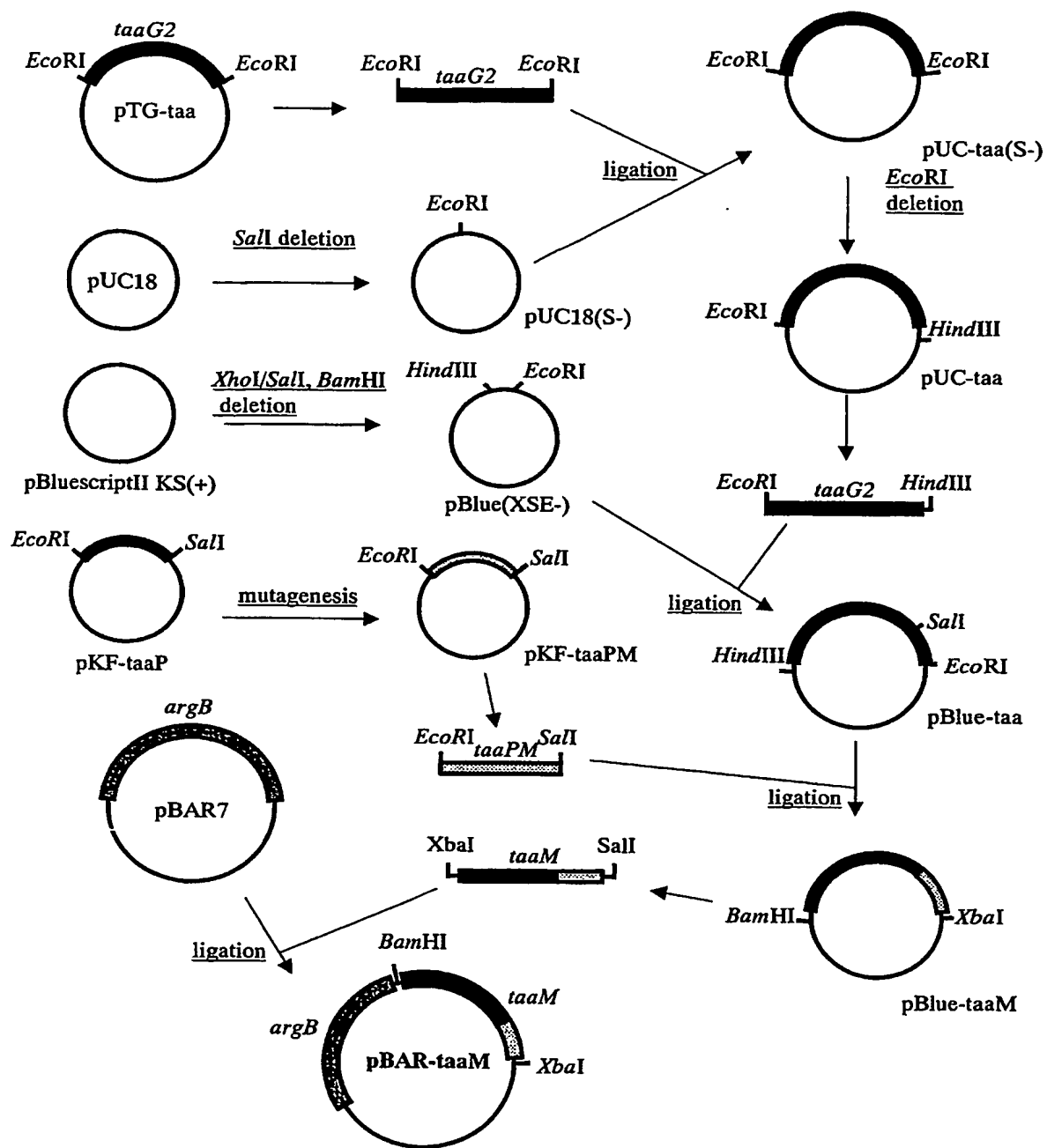
【図 1】

```
1 GAATTCATGG TGTTTTGATC ATTTTAAATT TTTATATGGC GGGTGGTGGG CAACTCGCTT 60
60 CCGGGCAACT CGCTTACCGA TTACGTTAGG GCTGATATTT ACGTAAAAAT CGTCAAGGGA 120
121 TGCAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCCGGAGT CAACAGCATC CAAGCCCAAG TCCTTCACGG 180
181 AGAAACCCCA GCGTCCACAT CACGAGCGAA GGACCACCTC TAGGCATCGG ACGCACCATC 240
241 CAATTAGAAG CAGCAAAGCG AAACAGCCCA AGAAAAAGGT CGGCCCGTCG GCCTTTTCTG 300
301 CAACGCTGAT CACGGGCAGC GATCCAACCA ACACCCTCCA GAGTGACTAG GGGCGGAAAT 360
361 TTAAAGGGAT TAATTTCCAC TCAACCACAA ATCACAGTCG TCCCCGGTAT TGTCCGTCAG 420
421 AATGCAATTT AAACCTTTCT GCGAATCGCT TGGATTCCCC GCCCCTGGCC GTAGAGCTTA 480
481 AAGTATGTCC CTTGTCGATG CGATGTATCA CAACATATAA ATACTAGCAA GGGATGCCAT 540
541 GCTTGGAGGA TAGCAACCGA CAACATCACA TCAAGCTCTC CCTTCTCTGA ACAATAAACC 600
601 CCACAGAAGG CATTT 615
```

【図 2】



【図3】



taaG2 : タカアミラーゼA遺伝子

argB : オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子(選択マーカー)

taaM : 改変プロモーターを含んだタカアミラーゼ遺伝子

【図 4】

プロモーター	アミラーゼ生産量 (mg/L)					
	デンプン			マルトース		
	ABPU1	$\Delta agdB$	$ABPU1/\Delta agdB$	ABPU1	$\Delta agdB$	$ABPU1/\Delta agdB$
Taa	68	397	5.8	81	572	7.1
PCSb	325	332	1.0	363	727	2.0
PCSPb	478	N.D.	—	462	1031	2.2

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 目的のタンパク質をコードする遺伝子を導入した際に当該遺伝子の発現を効率的に高めることが可能な宿主微生物を提供する。また、目的のタンパク質を高い効率で産生可能な形質転換体を提供する。更には、目的のタンパク質を高い生産性で産生可能な生産方法を提供する。

【解決手段】 真菌類に属し且つ主たるイソマルトース生成酵素の遺伝子を欠損した微生物である。当該微生物に目的のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る。導入された遺伝子が発現可能な条件下で当該形質転換体を培養してタンパク質を産生させる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 3 0 7 9 2 2
受付番号	5 0 2 0 1 5 9 3 7 3 7
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 4 年 1 0 月 2 4 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成14年10月23日

次頁無

特願 2 0 0 2 - 3 0 7 9 2 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 2 1 6 1 6 2]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 1 2 月 1 1 日

[変更理由]

名称変更

住 所

愛知県名古屋市中区錦 1 丁目 2 番 7 号

氏 名

天野エンザイム株式会社